

Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina

Publicado: 07/02/2014

Autor/s. : Carla Christine Lange, Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito, Edna Froeder Arcuri, Guilherme N. Souza e Marco Antônio Machado, Embrapa Gado de Leite, MG; José R.F. Brito, Pólo de Excelência do Leite/SECTES (Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior), MG; Robert Domingues, Biólogo, Bolsista de Apoio Técnico da Fapemig, MG, e Alessandra P.S. Salimena, Estudante do Curso de Biologia, Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, MG.

Sumário

O objetivo deste trabalho foi identificar espécies de *Staphylococcus* (n=100) isoladas de mastite em rebanhos bovinos do Estado de Minas Gerais. Para esta finalidade foram utilizadas reações de PCR empregando oligonucleotídeos iniciadores descritos anteriormente para amplificar genes específicos de *S. aureus* (*femA*), *S. intermedius* (rDNA 16S) e *S. hyicus* (rDNA 16S-23S) e o sequenciamento do rDNA 16S. De acordo com as reações de PCR, 83 isolados foram identificados como *S. aureus*, 13 isolados como *S. intermedius*, dois como *S. hyicus* e dois isolados não foram identificados. Foram submetidos ao sequenciamento do rDNA 16S seis isolados identificados como *S. aureus* e os 17 restantes. Os seis isolados identificados como *S. aureus* confirmaram essa identificação. Dos outros 17 isolados, 13 foram identificados como *S. chromogenes* e quatro como *S. hyicus*, com similaridade igual ou superior a 99%. Baseando-se nos resultados da reação de PCR do gene *femA* e do sequenciamento do rDNA 16S, foram identificados 83 *S. aureus*, 13 *S. chromogenes* e quatro *S. hyicus*. Neste estudo os oligonucleotídeos iniciadores empregados na reação de PCR para *S. intermedius* não foram específicos, pois amplificaram também *S. chromogenes*; e os empregados na reação de PCR para *S. hyicus* não foram sensíveis, pois falharam na identificação de dois isolados de *S. hyicus*. A identificação definitiva das duas últimas espécies somente foi possível pelo sequenciamento do rDNA 16S.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Estafilococos coagulase positivos, estafilococos coagulase negativos, infecção intramamária, *Staphylococcus aureus*, *S. chromogenes*, *S. hyicus*.

mastite bovina. Entre as espécies mais frequentemente isoladas, *S. aureus* é um patógeno primário, responsável por infecções clínicas e subclínicas e altas contagens de células somáticas (CCS) no leite (National Mastitis Council 2004). Duas outras espécies coagulase positivas, *S. hyicus* e *S. intermedius* têm sido relatadas como causas de mastite, mas são encontradas menos frequentemente nos rebanhos leiteiros (Hodges et al. 1984, Roberson et al. 1996, Capurro et al. 1999, Giannechini et al. 2002). As demais espécies de *Staphylococcus*, classificadas como coagulase negativas, são consideradas patógenos secundários. O grupo dos *Staphylococcus* coagulase negativos compreende cerca de 40 espécies e subespécies (Bannerman 2003), cuja identificação completa depende de muitos testes fenotípicos ou de testes moleculares, nem sempre disponíveis na rotina do diagnóstico microbiológico. A presença de estafilococos coagulase negativos na glândula mamária está, geralmente, associada a quadros moderados de inflamação. Entretanto, em rebanhos com baixa CCS essas bactérias contribuem para o aumento da CCS do leite total do rebanho (Schukken et al. 2009).



Link recomendado



VICTAM LatAm 2023

A taxonomia do gênero *Staphylococcus* foi melhor esclarecida nos últimos anos graças ao emprego de técnicas de biologia molecular que permitiram relacionar ou comparar os resultados dos testes fenotípicos e genotípicos. Novas espécies foram descritas (Foster et al. 1997, Devriese et al. 2005) e reclassificações ocorreram (Sasaki et al. 2007). Entre esses métodos, a análise comparativa da sequência de determinados genes de macromoléculas conservadas tem sido empregada para a classificação de microrganismos. Um exemplo dessas macromoléculas é o RNA ribossomal, essencial para a sobrevivência dos organismos, e altamente conservado entre as bactérias. O sequenciamento do gene do RNA ribossomal 16S tem sido extensivamente usado com finalidade taxonômica e filogenética (Becker et al. 2004) e é considerado o método de referência para a identificação bacteriana (Nolte &

Information (NCBI) e Ribosomal Differentiation of Microorganisms (RIDOM) (Becker et al. 2004).

O objetivo deste trabalho foi identificar espécies de *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina no Estado de Minas Gerais, presuntivamente identificadas como *Staphylococcus* coagulase positivos. Para esta finalidade foram utilizadas reações de PCR para amplificar genes específicos das espécies *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* e o sequenciamento do rDNA 16S.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados bacterianos

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Leite, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/ MG. Foram analisados 100 isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de vacas bovinas com mastite clínica ou subclínica, presuntivamente identificados como coagulase positivos. Os isolados se originaram de um estudo anterior, realizado em propriedades leiteiras de diferentes municípios do Estado de Minas Gerais, nos anos de 2002 e 2003 (Souza et al. 2009). As bactérias foram classificadas no gênero *Staphylococcus* de acordo com as características das colônias em ágar-sangue, morfologia e coloração de Gram, teste de catalase, Voges- Proskauer (produção de acetoína) e coagulase (NMC 2004). As bactérias permaneceram estocadas a -20oC e a -80oC em meio contendo leite em pó desnatado e glicerol até o momento dos testes moleculares.



Link recomendado

Agrifirm do Brasil



Reações de PCR

Pecuária de leite

[Iniciar sessão](#)

intermedius. Para identificação de *S. aureus* foram usados oligonucleotídeos descritos por Mehrotra et al. (2000), que amplificam um fragmento do gene femA, de 132 pares de bases (pb). Para a identificação de *S. intermedius* foram usados oligonucleotídeos descritos por Wakita et al. (2002), que amplificam um fragmento do rDNA 16S, de 901 pb.

E para a identificação de *S. hyicus* foram usados oligonucleotídeos descritos por Forsman et al. (1997), que amplificam um fragmento do rDNA 16S-23S, de 250 pb. A extração de DNA das culturas foi realizada de acordo com Hesselbarth & Schwarz (1995). O DNA foi quantificado em espectrofotômetro (GeneQuantpro, Amersham Biosciences) e as quantidades ajustadas para a reação de PCR (50-100 µg/µl).

Para a amplificação do gene femA, as reações foram incubadas a 94oC por 4 min., submetidas a 5 ciclos de 94oC por 45 seg., 56oC por 45 seg. e 72oC por 45 seg.; 20 ciclos de 72oC por 45 seg., 94oC por 45 seg. e 72oC por 45 seg.; e uma extensão final de 72oC por 5 min. Para amplificação dos genes rDNA 16S e rDNA 16S-23S, as reações foram incubadas a 94oC por 5 min., submetidas a 25 ciclos de 94oC por 1 min., 53oC por 1 min. e 72oC por 1 min. e 30 seg., com uma extensão final de 72oC por 10 minutos. A reações foram realizadas em termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems) e os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose (1,5%, p/v), corados com solução de brometo de etídio (0,005%, p/v). O registro das imagens foi feito em fotodocumentador (Eagle Eye II, Stratagene).



Link recomendado

Evonik Animal Nutrition



As cepas-padrão *S. aureus* ATCC 51651, *S. hyicus* ATCC 11249, *S. intermedius* ATCC 29663, *S. capitis* ATCC 35661, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. gallinarum* 700401, *S. haemolyticus* ATCC 29970, *S. lentus* ATCC 700403, *S. lugdunensis* ATCC 49576, *S. saprophyticus* ATCC 15305, *S. sciuri* ATCC 29061, *S. simulans* ATCC

Sequenciamento do rDNA 16S

Foram submetidos ao sequenciamento do rDNA 16S seis isolados identificados como *S. aureus* (pelo PCR do gene *femA*) e todos os isolados não identificados como *S. aureus*. As cepas- padrão citadas acima foram usadas como controles.

O DNA bacteriano foi extraído como citado anteriormente. O DNA foi amplificado por PCR com os oligonucleotídeos 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e 5'- GTATTACCGCGGCTG CTG-3', que amplificam um produto de 536 pb. O programa de PCR iniciou-se com uma etapa de desnaturação de 5 min., seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 seg., 55oC por 30 seg. e 74oC por 2 min., com uma extensão final de 74oC por 5 min. Os produtos obtidos foram purificados com um kit de purificação (illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), de acordo com as especificações do fabricante. Uma alíquota de 200ng do DNA purificado foi usada como matriz para as reações de sequenciamento, nas quais foi utilizado o kit de sequenciamento DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare, NYSE, Germany) e 0,5µM do mesmo oligonucleotídeo utilizado para a reação de PCR. As reações de sequenciamento foram precipitadas com etanol, inseridas no equipamento MegaBACE 1000 DNA sequencer (GE Healthcare, NYSE, Germany) e submetidas a 6 kV por 160 min. As reações foram preparadas separadamente com os dois oligonucleotídeos iniciadores de modo a se obter duas sequências para cada amostra analisada.



Link recomendado

Yara Brasil



Os pares de sequências foram editados e reunidos utilizando- se o software SeqMan (LaserGene package, DNASTAR). As sequências resultantes foram comparadas com sequências bacterianas depositadas na base de dados do NCBI.

As reações de PCR para amplificação dos genes *femA* (*Staphylococcus aureus*), rDNA 16S (*S. intermedius*) e rDNA 16S-23S (*S. hyicus*) foram inicialmente estabelecidas com as cepas-padrão citadas no Material e Métodos. Apresentaram produtos de amplificação específicos para os genes citados acima *S. aureus* ATCC 51651, *S. intermedius* ATCC 29663 e *S. hyicus* ATCC 11249, respectivamente.

Dos 100 isolados, 83 apresentaram um produto de amplificação (132 pb) na reação de PCR para *S. aureus*, enquanto que 17 isolados não apresentaram nenhum produto de amplificação nesta reação. Treze isolados apresentaram um produto de amplificação de 901 pb na reação de PCR para identificar *S. intermedius* (87 isolados foram negativos). Dois isolados apresentaram um produto de amplificação específico de 250 pb na reação de PCR para identificar *S. hyicus*, além de um fragmento inespecífico de cerca de 400 pb, cuja ocorrência também foi relatada por Forsman et al. (1997). Os demais isolados (n=98) foram negativos nesta reação. Resumindo, pelas reações de PCR, 83 isolados foram identificados como *S. aureus*, 13 isolados como *S. intermedius*, dois como *S. hyicus* e dois isolados não foram identificados (Quadro 1).

Quadro 1. Resultados dos testes usados na identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas neste estudo.



Link recomendado

VICTAM LatAm 2023





apresentaram resultado positivo na prova da coagulase em tubo e 77 deles (93%) apresentaram resultado positivo no teste de Voges-Proskauer. Nenhum isolado de *S. chromogenes* e *S. hyicus* foi positivo no teste de Voges-Proskauer, confirmando a importância deste teste na identificação fenotípica de *S. aureus*.

Em virtude da coincidência dos resultados dos testes fenotípicos e do PCR do *femA*, seis isolados foram submetidos ao sequenciamento do rDNA 16S para a confirmação da identidade. Os 17 isolados restantes, não identificados como *S. aureus*, foram também submetidos ao sequenciamento do rDNA 16S, além das 14 cepas-padrão citadas anteriormente. O sequenciamento confirmou a identificação dos seis isolados de *S. aureus*. Treze isolados foram identificados como *S. chromogenes* e quatro isolados como *S. hyicus*.

A identidade das quatorze cepas-padrão incluídas neste estudo também foi confirmada pelo sequenciamento. Cada isolado foi relacionado a uma espécie de acordo com o menor valor E (E-value) e a maior similaridade. Todos os isolados apresentaram similaridade maior ou igual a 99%. Apenas um isolado apresentou o valor E diferente de zero (a cepa-padrão *S. intermedius* ATCC 29663).

No fragmento de 536 pb sequenciado, o número de pares de bases diferentes entre as espécies avaliadas variou de 6 a 28. Entre *S. aureus* e *S. hyicus* houve diferença em 22 pares de bases, entre *S. aureus* e *S. intermedius* (cepa-padrão) foram encontradas diferenças em 28 pares de bases e entre *S. aureus* e *S. chromogenes*, em 23 pares de bases. Entre *S. hyicus* e *S. intermedius* (cepa-padrão) foram encontradas diferenças em seis pares de bases, entre *S. hyicus* e *S. chromogenes*, em nove pares de bases e entre *S. intermedius* (cepa-padrão) e *S. chromogenes*, também uma diferença em nove pares de bases. Concluindo, entre *S. aureus* e as outras três espécies (*S. hyicus*, *S. chromogenes* e *S. intermedius*) o número de pares de bases não coincidentes foi maior do que 20, enquanto que entre as espécies *S. hyicus*, *S. chromogenes* e *S. intermedius* o número de pares de bases não coincidentes foram de seis a nove. Portanto, neste fragmento de 536 pb, houve uma grande similaridade entre *S. hyicus*, *S. intermedius* e *S. chromogenes*.



Link recomendado



Com a identificação da espécie *S. chromogenes* pelo sequenciamento do rDNA 16S, a prova da coagulase em tubo foi refeita para estes isolados, confirmando a positividade em alguns deles. Nestes últimos isolados deverá ser pesquisada a atividade de coagulação, que pode também ser causada por interferência de proteases, conforme estudos realizados por Wegrzynowicz et al. (1979), Chomarat & Flandrois (1984) e Vandenesch et al. (1994).

Comparando os resultados do sequenciamento com os das reações de PCR, a reação de PCR para *S. intermedius* identificou corretamente a cepa-padrão *S. intermedius* ATCC 29663 e não identificou as outras cepas-padrão, entretanto produtos de amplificação de 901 pb foram obtidos de todos os isolados identificados como *S. chromogenes* pelo sequenciamento. A reação de PCR para *S. hyicus* amplificou a cepa-padrão *S. hyicus* ATCC 11249 e não amplificou as outras cepas-padrão. Produtos de amplificação de 250 pb foram obtidos com dois isolados identificados como *S. hyicus* pelo sequenciamento. Entretanto, falhou em identificar outros dois isolados identificados como *S. hyicus* pelo sequenciamento. Portanto neste estudo os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Wakita et al. (2002) para *S. intermedius* não foram específicos, pois amplificaram também *S. chromogenes*; e os empregados para *S. hyicus* (Forsman et al. 1997) não foram sensíveis, pois falharam na identificação de dois isolados de *S. hyicus*.

O isolamento de *S. chromogenes* está de acordo com resultados encontrados por Birgersson et al. (1992), Aarestrup & Jensen (1997), Taponen et al. (2006, 2008), Gillespie et al. (2009) e Sampimon et al. (2009), que mostraram a disseminação deste agente em rebanhos bovinos. De acordo com Pyörälä & Taponen (2009) *S. chromogenes* e *S. simulans* são atualmente os estafilococos coagulase negativos mais frequentemente isolados de mastite bovina.



Link recomendado

Evonik Animal Nutrition



et al. (2009), todos em rebanhos bovinos. Em estudos mais antigos (anos 80) *S. hyicus* era isolado com maior frequência, que pode ter sido em decorrência de uma identificação errônea por causa dos sistemas propostos na época (Bes et al. 2000), ou pelo fato de *S. chromogenes* ser caracterizado na época como *S. hyicus* (*S. hyicus* subsp. *chromogenes*) (Sampimon et al. 2009).

CONCLUSÕES

Foram identificadas as espécies *Staphylococcus aureus*, *S. hyicus* e *S. chromogenes* dos 100 isolados de *Staphylococcus* spp. analisados.

S. aureus foi identificado por PCR do gene *femA* e a identificação foi confirmada pelo sequenciamento do rDNA 16S.

As reações de PCR para identificar *S. intermedius* e *S. hyicus*, utilizando oligonucleotídeos descritos na literatura, não foram eficientes para identificar estas espécies.

Os isolados não identificados como *S. aureus* foram identificados como *S. chromogenes* e *S. hyicus* pelo sequenciamento do rDNA 16S.

A identificação definitiva das duas últimas espécies somente foi possível pelo sequenciamento do rDNA 16S.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (CVZ 1816/06) e à Embrapa (MP 03.07.05.013.00/ Agrofuturo) pelo apoio financeiro. José Renaldi Feitosa Brito e Robert Domingues foram bolsistas da Fapemig (Convênio 10132/07 e Pronex 4695/EDT 470/07). Alessandra Pereira Sant'Anna Salimena foi bolsista da Fapemig (CVZ 1816/06).

REFERÊNCIAS



Link recomendado



Yara Brasil

Bannerman T.L. 2003. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase- positive cocci that grow aerobically, p.384-404. In: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A. & Tenover F.C. (Eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. ASM Press, Washington.

Becker K., Harmsen D., Mellmann A., Meier C., Schumann P., Peters G. & von Eiff C. 2004. Development and evaluation of a qualitycontrolled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNAbased identification of *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 42(11):4988-4995.

Bes M., Guérin-Faublée V., Meugnier H., Etienne J. & Freney J. 2000. Improvement of the identification of staphylococci isolated from bovine mammary infections using molecular methods. *Vet. Microbiol.* 71:287- 294.

Birgersson A., Jonsson P. & Holmberg O. 1992. Species identification and some characteristics of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine udders. *Vet. Microbiol.* 31:181-189.

Capurro A., Concha C., Nilsson L. & Ostensson K. 1999. Identification of coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *Acta Vet. Scandinavica* 40(4):315-321.

Chomarat M. & Flandrois J.-P. 1984. Frequency of pseudocoagulase production in *Staphylococcus aureus*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene A* 258:441-448.

Devriese L., Vancanney M., Baele M., Vaneechoutte M., De Graef E., Snauwaert C., Cleenwerck I., Dawyndt P., Swings J., Decostere A. & Haesebrouck F. 2005. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int. J. System. Evolution. Microbiol.* 55:1569-1573.

Microbiology 143:3491-3500.

Foster G., Ross H.M., Hutson R.A. & Collins M.D. 1997. *Staphylococcus lutrae* sp. nov., a new coagulase-positive species isolated from otters. *Int. J. System. Bacteriol.* 49:489-502.



Link recomendado



VICTAM LatAm 2023

Giannechini R., Concha C., Rivero R., Delucci I. & Moreno Lopes J. 2002. Occurrence of clinical and subclinical mastitis in dairy herds in the west littoral region in Uruguay. *Acta Vet. Scand.* 43(4):221-230.

Gillespie B.E., Headrick S.I., Boonyayatra S. & Oliver S.P. 2009. Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. *Vet. Microbiol.* 134:65-72.

Hesselbarth J. & Schwarz S. 1995. Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* from dogs, pigeons, horses and mink. *Vet. Microbiol.* 45:11-17.

Hodges R.T., Jones Y.S. & Holland J.T. 1984. Characterization of staphylococci associated with clinical and subclinical bovine mastitis. *N. Z. Vet. J.* 32(9):141-145.

Mehrotra M., Wang G. & Johnson W.M. 2000. Multiplex PCR for the detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin, and methicillin resistance. *J. Clin. Microbiol.* 38:1032-1041.

National Mastitis Council 2004. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. 4th ed. National Mastitis Council, Verona. 47p.

Nolte F.S. & Caliendo A.M. 2003. Molecular detection and identification of microorganisms, p.234-256. In: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A. & Tenover F.C. (Eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. ASM Press, Washington.

Roberson J.R., Fox L.K., Hancock D.D., Gay J.M. & Besser T.E. 1996. Prevalence of coagulase-positive staphylococci, other than *Staphylococcus aureus*, in bovine mastitis. *Am. J. Vet. Res.* 57(1):54-57.

Sampimon O.C., Barkema H.W., Berends I.M.G.A., Sol J. & Lam T.J. G.M. 2009. Prevalence and herd-level risk factors for intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in Dutch dairy herds. *Vet. Microbiol.* 134:37-44.

Sasaki T., Kikuchi K., Tanaka Y., Takahashi N., Kamata S. & Hiramatsu K. 2007. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *J. Clin. Microbiol.* 45(9):2770-2778.



Link recomendado



Agrifirm do Brasil

Schukken Y.H., González R.N., Tikofsky L.L., Schulte H.F., Santisteban C.G., Welcome F.L., Bennett G.J., Zurakowski M.J. & Zadoks R.N. 2009. CNS mastitis: Nothing to worry about? *Vet. Microbiol.* 134:9-14.

Souza G.N., Brito J.R.F., Moreira E.C., Brito M.A.V.P. & Silva M.V.G.B. 2009. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61:1015-1020.

Taponen S., Simojori H., Haveri M., Larsen H.D. & Pyörälä S. 2006. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Vet. Microbiol.* 115:199-207.

Taponen S., Björkroth J. & Pyörälä S. 2008. Coagulase-negative staphylococci isolated from bovine extramammary sites and intramammary infections in a single dairy herd. *J. Dairy Res.* 75:422-429.

Vandenesch F., Lebeau C., Bes M., Lina G., Lina B., Greenland T., Benito Y., Brun Y., Fleurette J. & Etienne J. 1994. Clotting activity in *Staphylococcus schleiferi*



2002. Development of a PCR test for the identification of Staphylococcus intermedius based on the 16S rDNA sequence. J. Vet. Med. Sci. 64(7):603-605.

Wegrzynowicz Z., Heczko P.B., Jeljaszewicz J., Neugebauer M. & Pulverer G. 1979. Pseudocoagulase activity in staphylococci. J. Clin. Microbiol. 9(1):15-19.

*****O trabalho foi originalmente publicado em Pesq. Vet. Bras. 31(1):36-40, janeiro 2011**

Autor/s. :

Carla Christine Lange

[Siga](#)

Possui graduação em Medicina Veterinária (1988) e mestrado em Ciências Veterinárias (1994) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e doutorado em Medicina Veterinária pela Escola Superior de Medicina Veterinária de Hannover - Tierärztliche Hochschule Hannover (1998). É Pesquisador A da Embrapa Gado de Leite. Tem experiência na área de Microbiologia Veterinária, com ênfase em Microbiologia Aplicada. Atua no Núcleo de Qualidade do Leite, principalmente na pesquisa vinculada à microbiologia do leite e da glândula mamária.

Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito

[Siga](#)

Graduação em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP, 1973), mestrado em Microbiologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ, 1979), doutorado em Microbiologia e Imunologia Veterinárias - University of Bristol (1989), UK, e pós-doutorado no Eastern Regional Reseach Center, do ARS nos EUA (2005 - 2006). Possui experiência acadêmica como professora de Virologia, de Bioquímica e Microbiologia. Desde 1979 é pesquisadora da Embrapa, atuando desde 1993 na Embrapa Gado de Leite, MG.

Edna Froeder Arcuri

[Siga](#)

Marco Antônio Machado

[Siga](#)

276



0



Estatísticas



Ver todos os comentários



Novas estratégias para o tratamento da mastite bovina - parte 2.

